

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16829

研究課題名(和文) 子宮体癌における腫瘍微小環境プロファイルに基づく新規分子標的治療の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel molecular targeted therapies based on tumor microenvironmental profile in endometrial cancer

研究代表者

志鎌 あゆみ (Shikama, Ayumi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40778627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌の腫瘍微小環境と予後の関連性を明らかにすることとした。子宮内膜癌検体において、腫瘍微小環境マーカーのPD-L1、CD8、CD68、VEGFの蛋白発現と予後の関連性を解析した。全生存期間の単変量解析では、腫瘍細胞でのPD-L1の高発現が予後良好因子、腫瘍細胞周囲でのPD-L1の高発現、高齢、進行癌、非類内膜癌、深い筋層浸潤、脈管侵襲陽性が予後不良因子であった。多変量解析では、腫瘍細胞でのPD-L1の高発現、高齢、進行期、非類内膜癌、脈管侵襲陽性が独立予後因子であった。PD/PD-L1を介した免疫チェックポイント機構が、子宮内膜癌での腫瘍微小環境を調節し、予後に影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜癌における腫瘍微小環境と予後との関連性の調査結果より、PD-L1とCD4陽性ヘルパーT細胞が化学療法感受性に関与すること、PD/PD-L1を介した免疫チェックポイント機構が、子宮内膜癌での腫瘍微小環境を調節することにより、予後を改善する可能性があることが示唆された。このことは、選択肢の少ない子宮内膜癌の治療戦略において、免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせる治療の可能性を拡大する上で重要な知見となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study was to investigate the precise prognostic significance of the Tumor microenvironment (TME) profile in endometrial carcinoma. We performed immunohistochemistry of the TME proteins, PD-L1, PD-1, CD4, CD8, CD68, and VEGF in endometrial carcinomas from 221 patients. High PD-L1 in tumor cells (TCs) was associated with better OS, whereas high PD-L1 in tumor-infiltrating immune cells (TICs) was associated with worse OS. Univariate and multivariate analyses of prognostic factors revealed that high PD-L1 in TCs and high density of CD4+ TICs were significant and independent for favorable OS. The current findings indicate that PD-L1 and CD4+ helper T cells may be reasonable targets for improving survival through manipulating chemosensitivity, providing significant implications for combining immunotherapies into the therapeutic strategy for endometrial carcinoma.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 腫瘍微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年国内では、食生活の欧米化によるメタボリックシンドロームの増加と、晩婚化・少子化といった女性のライフサイクルの変化に伴い、子宮内膜への内因性エストロゲン作用の増加により、子宮体癌の罹患率が依然として増加傾向にあり、ついに子宮頸癌の罹患率を追い越している。またこれまでに、各種癌の様々な原因遺伝子が報告されており、最近ではそれらを標的とする数多くの分子標的治療薬が開発され、個々の癌が持つ遺伝的特徴に基づき、個別化治療を行う gene targeting therapy が盛んになりつつあるが、子宮体癌に関しては有効な分子標的薬はいまだ同定されていない。例えば乳癌では、HER2 蛋白の強発現例に対してトラスツズマブ(ハーセプチン)が用いられ、また抗癌剤の選択においても、薬剤耐性遺伝子の有無や、塩酸イリノテカンにおける UGT1A1 遺伝子のように、患者の有害事象をより強く起こしやすい遺伝子多型に基づいて抗癌剤を選択することが、臨床応用化されている。個々の癌における遺伝子情報に基づいて、より多くのベネフィットが期待できる患者群を同定することは臨床的に重要であり、また分子標的薬は高価であり医療経済学的にも重要である。我々はこれまでに、当科で初回治療を施行した子宮体癌 221 症例において (Shikama A, et al. *Gynecol Oncol.* 2016;140(2):226-33) DNA ミスマッチ修復機構 (MMR) の解析 (すなわち MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 蛋白の免疫染色および MLH1 プロモーター領域のメチル化解析) により、患者を Probable Lynch Syndrome (PLS) 群と Sporadic 群に分類したところ、有意に PLS 群の方が予後良好であることがわかった。さらに術後補助療法を追加しなかった症例で見ると両群で予後は同じであるにも関わらず、術後補助療法を追加した症例ではやはり PLS 群の方が予後良好の傾向が見られた。従って、MMR の解析により PLS 群を探索することで、術後補助療法に対する反応性が高く予後良好な患者群を同定できる可能性がある。MMR と予後との関連については、大腸癌では既に MMR 不全は化学療法後の予後良好と相関することが報告されている (Zaanan A, et al. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7470-8; Sinicrope FA, et al. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:863-75; Bertagnolli MM, et al. *J Clin Oncol.* 2009;27:1814-21)。

さらに分子標的薬の中でも、最近様々な種類の癌において前例のない持続的な臨床的奏功を示している免疫チェックポイント (PD-1/PD-L1) 阻害薬は、その大腸癌に対する有効性が MMR 不全やマイクロサテライト不安定性 (MSI) と相関することが報告されているが、子宮体癌については不明である。癌細胞は PD-1/PD-L1 を介して抗腫瘍免疫を抑制することで宿主免疫から逃避しているが、PD-1/PD-L1 を阻害することで免疫応答を再賦活化し抗腫瘍効果を得るのが、免疫チェックポイント阻害薬の作用機序である。主に卵巣癌、悪性黒色腫において、癌細胞を取り巻く腫瘍微小環境での免疫分子の発現プロファイルが、免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性を予測すると報告されているが、子宮体癌については不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は子宮体癌における腫瘍微小環境で機能する様々な分子の発現プロファイルが、臨床病理学的因子および治療予後とどのような関連性があるのか、MSI・MMR 不全とどのような関連性があるのかを解析し、また今後導入される可能性の高い免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性を予測するバイオマーカーの探索を行うことである。

3. 研究の方法

当科で初回治療を行った子宮体癌約 200 症例の手術検体のパラフィン包埋ブロックから、腫瘍組織とその辺縁を含む薄切標本を作製し、腫瘍微小環境で機能する分子として、PD-1, PD-L1, キラーT細胞のマーカーである CD8, 腫瘍関連マクロファージのマーカーである CD68, VEGF などに対する抗体により免疫染色を行い、それぞれの発現量を解析した。MSI 解析については National Cancer Institute が推奨する 2 種のモノヌクレオチドマーカー (BAT26, BAT25) と 3 種のダイヌクレオチドマーカー (D2S123, D5S346, D17S250) からなるベセスタマーカーを使用し、フラグメント解析を行った。2 つ以上のマーカーでアレレル変動を認めた症例を高頻度マイクロサテライト不安定 (MSI-high)、一つのみのマーカーでアレレル変動を認めた症例を低頻度マイクロサテライト不安定 (MSI-low) と判定し、いずれのマーカーでもアレレル変動を認めない症例をマイクロサテライト安定 (MSS) と判定した。MMR 不全については、MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 蛋白の免疫染色と MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化により解析した。MLH1 遺伝子プロモーターのメチル化は、DNA を使用してメチル化特異的 PCR (MS-PCR) により解析した。以上の解析と並行して、各症例の臨床病理学的因子、治療反応性、予後などを含めた臨床情報を収集し、腫瘍微小環境プロファイルとの相関性について、統計学的に解析した。

4. 研究成果

私たちは 221 例の子宮内膜癌において、MSI 解析、MMR 機能に加えて、腫瘍微小環境のバイオマーカーである PD-L1, CD4, CD8, CD68, VEGF の免疫組織化学的評価を行い (図 1) 腫瘍微小環境プロファイルと予後との関連性を統計学的に解析した。

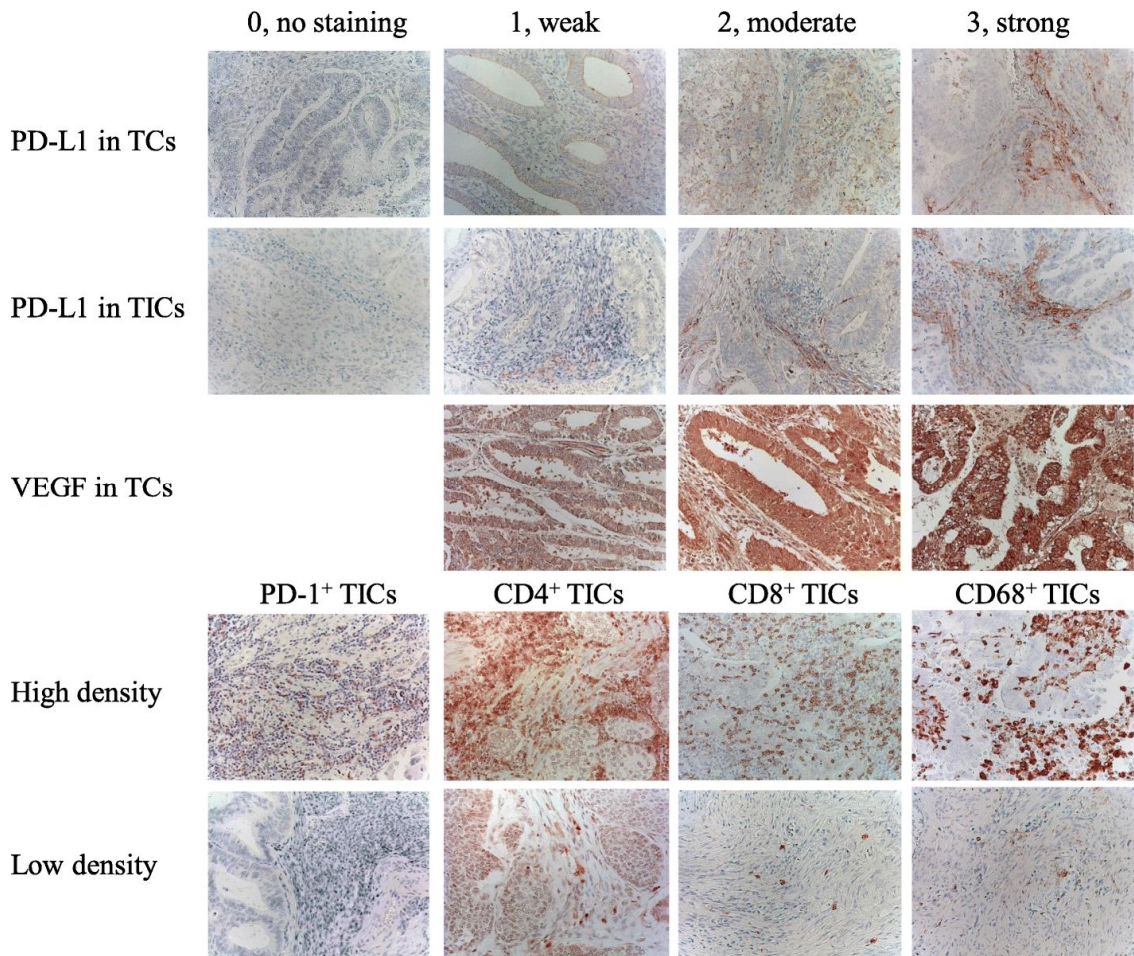
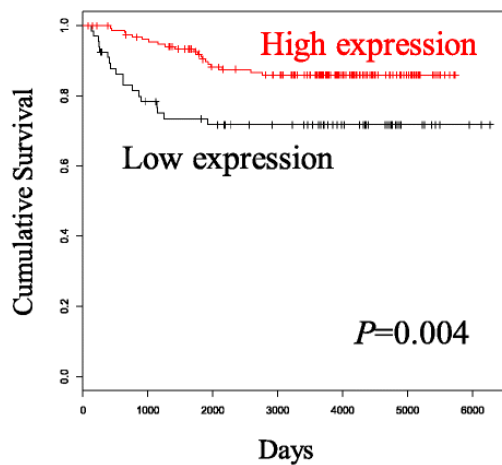


図 1: PD-L1、CD4、CD8、CD68、VEGF の免疫組織化学的染色

腫瘍細胞における PD-L1 高発現は、良好な全生存期間 (OS) と相関し ($p=0.02$)、腫瘍周囲細胞 (TIC) における PD-L1 高発現は、不良な OS と相関していた ($p=0.004$) (図 2A,B)。

A PD-L1 TCs



B PD-L1 in TICs

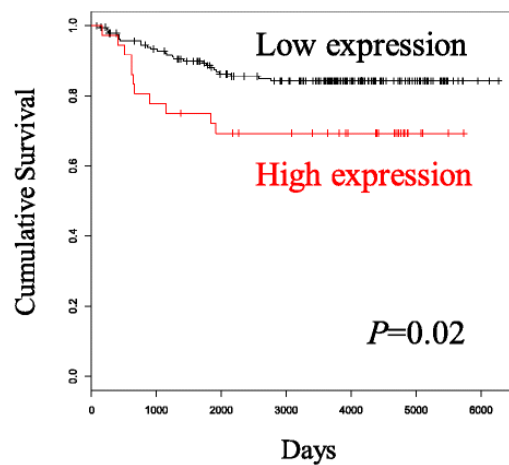


図 2: Kaplan-Meier curves for overall survival according to TME protein expressions in endometrial carcinomas. a, patients with TCs expressing high PD-L1 ($n = 74$) vs. low PD-L1 ($n = 147$); b, patients with TICs expressing high PD-L1 ($n = 36$) vs. low PD-L1 ($n = 185$)

TIC の PD-L1 高発現と、CD8 陽性腫瘍浸潤性リンパ球数、CD68 陽性腫瘍関連マクロファージ数、およびマイクロサテライト不安定性と有意な関連性を示し ($p = 0.00000064$, 0.00078 , および 0.0056)、腫瘍細胞の PD-L1 高発現と、再発症例における初回化学療法後の無治療期間 は相関した ($p = 0.000043$)。

単変量解析では、腫瘍細胞における PD-L1 高発現が予後良好因子、腫瘍周囲における PD-L1 高発現、高齢、進行癌、非類内膜腺癌、深い筋層浸潤および脈管侵襲陽性が予後不良因子であった ($p=0.005$, 0.023 , 0.0017 , 0.000000002 , 0.0000001 , 0.000007 , and 0.00011)。多変量解析では、腫瘍細胞における PD-L1 高発現、CD4 陽性腫瘍浸潤性リンパ球数が多いこと、進行期、非類内膜腺癌、および脈管侵襲陽性が独立した有意な予後因子であった ($p=0.014$, 0.0025 , 0.003 , 0.000042 , 0.0031 , and 0.028)。

	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
High PD-L1 expression in TCs	0.40	0.21–0.76	0.0050	0.43	0.22–0.85	0.014
High PD-L1 expression in TICs	2.25	1.12–4.54	0.023	0.76	0.31–1.82	0.53
High density of PD-1+ TICs	1.71	0.85–3.46	0.13	–	–	–
High VEGF expression in TCs	2.14	0.94–4.85	0.07	–	–	–
High density of CD4+ TICs	0.32	0.16–0.65	0.0015	0.31	0.15–0.67	0.0025
High density of CD8+ TICs	0.31	0.096–1.01	0.053	–	–	–
High density of CD68+ TICs	1.58	0.79–3.12	0.19	–	–	–
Age > 60	2.81	1.47–5.36	0.0017	1.36	0.68–2.72	0.39
FIGO stage III/IV (vs. I/II)	8.62	4.26–17.4	2.0E-09	5.50	2.43–12.5	0.000042
Non-endometrioid Endometrioid (vs.)	5.78	2.99–11.2	1.9E-07	3.31	1.50–7.32	0.0031
MI > 1/2	5.04	2.50–10.2	6.4E-06	1.46	0.66–3.19	0.35
LVI (+)	3.75	1.92–7.34	0.00011	2.27	1.09–4.73	0.028

図 3. Univariate and multivariate analyses of prognostic factors for OS

PD-L1 および CD4 +ヘルパーT 細胞が化学療法感受性を高めることにより、子宮内膜癌の予後に影響を及ぼすことが示唆された。従って、免疫チェックポイント阻害剤といった免疫療法が、化学療法との組み合わせにより、子宮内膜癌の有用な治療選択肢となる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuang Zhang, Takeo Minaguchi, Ayumi Shikama, Shuling Liu, Bouchra Lachkar, Nobutaka Tasaka, Azusa Akiyama, Manabu Sakurai, Sari Nakao, Hiroyuki Ochi, Toyomi Satoh
2. 発表標題 PD-L1 EXPRESSION IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR FOR SURVIVAL IN ENDOMETRIAL CARCINOMAS
3. 学会等名 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuang Zhang, Takeo Minaguchi, Ayumi Shikama, Shuling Liu, Bouchra Lachkar, Nobutaka Tasaka, Azusa Akiyama, Manabu Sakurai, Sari Nakao, Hiroyuki Ochi, Toyomi Satoh
2. 発表標題 Survival analyses based on tumor microenvironment profile in endometrial carcinoma
3. 学会等名 70th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考